

## 2型及び3型プロスタサイクリン誘導体のGC/MSを用いた超微量定量法の確立と病的動態の解析に関する研究

著者	西川 正純
号	389
発行年	1997
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/15200">http://hdl.handle.net/10097/15200</a>

氏 名（本籍）            にし            かわ            まさ            ずみ  
西            川            正            純

学 位 の 種 類            博            士   （ 薬    学 ）

学 位 記 番 号            薬            第            389            号

学位授与年月日            平 成   9   年   11   月   19   日

学位授与の要件            学位規則第4条第2項該当

学 位 論 文 題 目            2型及び3型プロスタサイクリン誘導体のGC／MS  
を用いた超微量定量法の確立と病的動態の解析に  
関する研究

論文審査委員            (主 査)  
教授 水 柿 道 直            教授 大 内 和 雄

教授 後 藤 順 一

## 論文内容要旨

アラキドン酸カスケードにより生合成されるプロスタグランジン (PG) およびロイコトリエンなどのプロスタノイドは、様々な生理活性を有し、生体内の機能調節等に重要な役割を担っている。特に、血管系では血管内皮細胞より血小板凝集抑制作用や血管平滑筋弛緩作用を有するプロスタサイクリンが、血小板より血小板凝集作用を有するトロンボキサンが産生され、プロスタサイクリンとトロンボキサンの産生量のバランスが動脈硬化症や心筋梗塞などの血管性疾患に深く関わっていることが明らかになっている。

近年、魚介類に含まれる $\omega$ 3系高度不飽和脂肪酸 (PUFA) であるエイコサペンタエン酸 (EPA) およびドコサヘキサエン酸 (DHA) の摂取量と、各種疾患特に血栓性疾患の罹患率との関連性が報告され、従来の2型PGより $\omega$ 3位に二重結合を一つ多く有する3型PGの生体内での役割が注目されている。しかしながら、この3型PGについては、標品が無いことなどから定量法が未だ確立されておらず、産生量はもとより2型PGと3型PGのバランスと各種疾患との関連性について定量的に論ずることはできなかった。

そこで本研究では、まずEPAから産生される3型プロスタサイクリンの定量法の確立を目的として、3型プロスタサイクリンの血中の安定代謝体の標品を調製し、そのガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー (GC/MS) による定量法を確立した。次に、生体試料からの3型プロスタサイクリンの検出あるいは濃縮・精製を容易にするために $\omega$ 3オレフィン構造を認識するモノクローナル抗体を作製した。そして、病態との関連性を明らかにするために、特に血栓性の合併症を発症する糖尿病との関連性を検討し、*in vivo*の系でプロスタサイクリンと病態との関連性を明らかにした。さらに、トロンボキサンとプロスタサイクリンの産生バランスと病態との関連性を明らかにするために、まず産生量の多い2型を対象としてプロスタサイクリンの尿中代謝体の測定法を確立し、糖尿病患者における尿中のトロンボキサン/プロスタサイクリンの産生バランスの変化を明らかにした。

### 1. 3型プロスタサイクリン誘導体標品の調製と定量法の確立

3型プロスタサイクリンの血中の安定代謝体の $\Delta^{17}$ -6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> の標品調製法の確立と [<sup>18</sup>O<sub>2</sub>] 標識体を内部標準物質とした定量法の開発を行った。牛大動脈内皮細胞を用いて EPA の生物変換を行い、 $\Delta^{17}$ -6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> の大量調製に成功した。そのメチルオキシム (MO)-メチルエステル (ME)-ジメチルイソプロピルシリル (DMIPS) エーテル誘導体は、分子イオンピークの *m/z* 711, イソプロピルラジカルの脱離に由来する [M-43]<sup>+</sup> (*m/z* 668) イオンは2型プロスタサイクリン由来の6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> のMO-ME-DMIPS エーテル誘導体の各フラグメントイオンよりも、2マスユニット少ない値を示した。次に、[<sup>18</sup>O<sub>2</sub>] 標識体の作製を行い、[<sup>18</sup>O<sub>2</sub>] と [<sup>18</sup>O<sub>1</sub>] の生成比はそれぞれ75.2と23.6%, 未反応の $\Delta^{17}$ -6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> は1.2%以下と、内部標準物質として使用可能な [<sup>18</sup>O<sub>2</sub>] 体の作製に成功した。調製した [<sup>18</sup>O<sub>2</sub>] 体を用いて GC/SIM 法で検量線を作製した。得られた検量線は10pg~5ng (*r* = 0.9983) の範囲で直線性を示し血中の $\Delta^{17}$ -6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> の定量が可能になった。

## 2. $\omega$ 3 オレフィン構造を認識するモノクローナル抗体の作製

GC/MS を用いた生体試料中の 3 型 PG の超微量定量法の前処理を迅速かつ簡便に行うため、またより高感度化をはかるため、抗 3 型 PG に特徴的な  $\omega$ 3 オレフィン構造を認識するモノクローナル抗体を作製した。 $\omega$ 3 オレフィン構造、すなわち *cis*-3-hexene-1-ol と HSA との結合体を活性エステル法により調製し、免疫原として用いてモノクローナル抗体を作製した。得られたモノクローナル抗体 (4 G 9-12B) は、 $\Delta^{17}$ -6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> 、6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  とモノクローナル抗体 4 G 9-12B との反応性を阻害 ELISA 法により検討した結果、 $\Delta^{17}$ -6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  の添加時にのみ 100fmol から 100pmol において用量依存的な阻害が認められ、同抗体は 2 型、3 型プロスタノイドの分別に有用であることが示された。次に、同抗体のイムノアフィニティカラムを作製し、EPA を摂取したヒト血中より  $\Delta^{17}$ -6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  を回収した。本前処理法により得られた GC/SIM クロマトから、本法は  $\Delta^{17}$ -6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  の分析法のクリーンアップ法として、選択制の高い、簡便な方法であることが明らかになった。

## 3. 健常人および糖尿病患者血中 2 型、3 型プロスタサイクリン量の変動

我々は先に *in vitro* において牛大動脈内皮細胞に糖尿病患者血清を添加するとプロスタサイクリンの産生が減少すること、さらに EPA を加えると 3 型プロスタサイクリンの産生量も増加することを報告している。この結果を *in vivo* において確認する目的で、健常人と NIDDM の血中の 2、3 型プロスタサイクリンの量を測定するとともに、EPA の摂取によって血中総プロスタサイクリン産生量が実際に亢進するか否かを検討した。NIDDM の血中含量は、40%以上の試料において 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  含量が 10pg/ml 以下と健常人に比べて低値であった。これは、*in vitro* の系の結果を裏付けるとともに、糖尿病患者では血液凝固系が亢進し、プロスタサイクリンの産生量の低下が血栓症などの合併症の発症の一因になっている可能性を示した。また、 $\Delta^{17}$ -6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  の含量は、NIDDM、健常人とも同様な結果であった。次に、EPA を摂取した NIDDM では血中の  $\Delta^{17}$ -6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  含量は EPA を摂取していない NIDDM に比して有意に増加した。このように、EPA の摂取により 3 型のプロスタサイクリンの産生量が増加することは、EPA が糖尿病患者の血液凝固系を改善させ、糖尿病の合併症として重篤な心筋梗塞や動脈硬化症などの予防に役立つものと考えられる。

## 4. 尿中プロスタサイクリン誘導体の定量法の確立

生体内のプロスタサイクリン/トロンボキサンバランスの変化を解析する目的で、採取が容易で試料採取の刺激による人工的な産生の少ない、尿試料を用いた分析法を確立した。2 型プロスタサイクリンの指標として尿中主要代謝産物である 2, 3-dinor-6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  を用いた。尿中より抽出した 2, 3-dinor-6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  は酸性条件下でスピロラクトン体とした後、メトキシアミンでラクトン環開環反応を行い、メチル化後、DMIPS エーテル誘導体に導き、GC/MS 分析を行った。この誘導体は、DMIPS エーテル誘導体に特徴的である [M-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>]<sup>+</sup> イオン (*m/z* 642) をベースピークイオンとして与えた。このフラグメントイオンをモニターリングイオンとして開発した本定量法は尿中 2, 3-dinor-6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>

含量の測定に、感度、安定性に優れた有用な方法といえる。

#### 5. 健常人および糖尿病患者尿中プロスタサイクリンおよびトロンボキサン量の変動

プロスタサイクリン／トロンボキサンバランスと病態との関係を明らかにする目的で、健常人および糖尿病患者尿中の2,3-dinor-6-keto-PGF<sub>1α</sub>および11-dehydro-TXB<sub>2</sub>の定量を検討した。健常人の尿中の2,3-dinor-6-keto-PGF<sub>1α</sub>および11-dehydro-TXB<sub>2</sub>含量を随時採取尿と24時間尿で検討したところ、クレアチニン補正により両検体間に著明な差は認められなかった。また、健常人の尿中11-dehydro-TXB<sub>2</sub>／2,3-dinor-6-keto-PGF<sub>1α</sub>含量比の平均は6.3であった。次に糖尿病患者の尿中の2,3-dinor-6-keto-PGF<sub>1α</sub>および11-dehydro-TXB<sub>2</sub>含量を測定した。外来患者の2,3-dinor-6-keto-PGF<sub>1α</sub>量は健常人に比べて低値を示した。また、11-dehydro-TXB<sub>2</sub>／2,3-dinor-6-keto-PGF<sub>1α</sub>含量比は、糖尿病患者で8以上と健常人に比べて高値を示し、糖尿病患者のトロンボキサン／プロスタサイクリンバランスが血栓誘発傾向に変化していることを示した。この結果は、糖尿病発症後の血栓症などの合併症の誘発の危険性を示すメルクマールとして有用であると考えられた。

以上の研究結果、2型、3型プロスタサイクリンの定量法および評価系を確立し、糖尿病の病態との相関性を明確に示すことを可能とした。

## 審査結果の要旨

アラキドン酸カスケードにより生合成されるプロスタグランジン (PG) は様々な生理活性を有し、生体内の機能調節等の重要な役割を担っている。特に、血管系では血管内皮細胞より血小板凝集抑制作用や血管平滑筋弛緩作用を有するプロスタサイクリン (PGI) が、血小板からは血小板凝集作用を有する тромбоキサン (TX) が産生され、PGI と TX の産生量の比が動脈硬化症や心筋梗塞などの血管性疾患に深く関わっている。また、魚介類に含まれる  $\omega$  3 系高度不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸 (EPA) に血栓性疾患の罹患率との関連性が報告され、生体内での役割が注目されている。しかしながら、この 3 型 PG については、標品が無いことなどから定量法が確立されておらず、産生量はもとより 2 型 PG と 3 型 PG の比と各種疾患との関連性について定量的に論ずることはできなかった。そこで本研究では、これらの問題を解決するために以下の検討を行った。

### 1. 3 型 PGI 誘導体標品の調製と定量法の確立

これまで定量法の無かった、3 型プロスタサイクリンの血中の安定代謝体  $\Delta^{17}$ -6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  を生物変換法により調製し、内部標準物質として有用な [<sup>18</sup>O<sub>2</sub>] 標識体の作製を行うとともに、メチルオキシム (MO)-メチルエステル (ME)-ジメチルイソプロピルシリル (DMIPS) エーテル誘導体を用いて、感度・選択性に優れる定量法を確立した。

### 2. $\omega$ 3 オレフィン構造を認識するモノクローナル抗体 (mAb) の作製

GC/MS を用いた生体試料中の 3 型 PG の超微量定量法の前処理を迅速かつ簡便に行い、より高感度化をはかるため、cis-3-hexene-1-ol と HSA との結合体を免疫原として用いて、3 型 PG に特異的な mAb を作製した。同抗体のイムノアフィニティークラムを用いるとき、EPA を摂取したヒト血中より  $\Delta^{17}$ -6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  が簡便にかつ定量的に回収された。

### 3. 健常人および糖尿病患者血中 2 型、3 型 PGI 量の変動

健常人とインスリン非依存型糖尿病 (NIDDM) の血中の 2, 3 型 PGI の量を測定するとともに、EPA の摂取効果を検討し、NIDDM 患者の血中 PGI の産生量の低下と EPA 投与による 3 型 PGI の産生量の増加を明らかにした。EPA が糖尿病患者の血液凝固系を改善させ、糖尿病の合併症として知られる心筋梗塞や動脈硬化症の予防に役立つ可能性を示した。

### 4. 尿中 PGI 誘導体の定量法の確立

2 型 PGI の尿中主要代謝産物である 2, 3-dinor-6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  の ME-MO-DMIPS 誘導体を用いた GC/SIM 法を確立し、採取が容易で試料採取の刺激による人工的な産生の少ない、尿試料を用いた分析を可能にした。

### 5. 健常人および糖尿病患者尿中 PGI および TX 量の変動

健常人および糖尿病患者尿中の 2, 3-dinor-6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  と 11-dehydro-TXB<sub>2</sub> を定量した。その結果、糖尿病患者の 11-dehydro-TXB<sub>2</sub>/2, 3-dinor-6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  比は健常人に比べて高値を示し、糖尿病患者の TX/PGI 比が血栓誘発傾向に変化していることを明らかにした。この結果は、糖尿病発症後

の血栓症などの合併症の誘発の危険性を示すメルクマールとして有用であると考えられた。

以上、本研究においてこれまで困難とされた、2型及び3型 PGI の簡易定量法および病態とプロスタノイドの関連性の定量的評価系が確立され、その糖尿病との関連性が明らかにされた。本研究の新規性と応用性を認める。よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として合格と認める。